

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009223 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01D 67/00

[DE/DE]; Obere Lindenbreite 11, 37077 Göttingen (DE).
NUSSBAUMER, Dietmar [DE/DE]; Im Tale 1, 37079
Göttingen (DE). HÖRL, Hans-Heinrich [DE/DE]; Schön-
berger Weg 16, 37120 Bovenden (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006564

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES,
FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:

21. Juni 2003 (21.06.2003)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 542.7 23. Juli 2002 (23.07.2002) DE

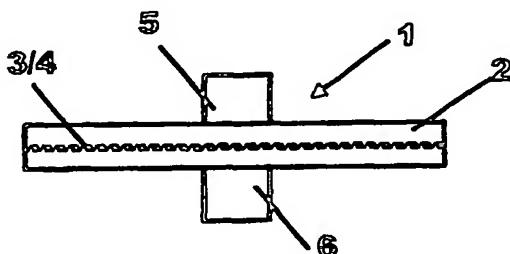
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SARTORIUS AG [DE/DE]; Weender Landstrasse
94-108, 37075 Göttingen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMMER, Wolfgang

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEMBRANE, FILTRATION MODULE AND METHOD FOR THE SEPARATION OF BIOMOLECULES FROM A LIQUID

(54) Bezeichnung: MEMBRAN, FILTRATIONSMODUL UND VERFAHREN ZUR ABTRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN
AUS EINER FLÜSSIGKEIT



(57) Abstract: The invention relates to a membrane, made from a microporous membrane body with an affinity ligand which is capable of interacting with at least one type of molecule found in a fluid, whereby the membrane body may be stored in a dried condition with retention of the activity of the affinity ligand. The invention further relates to a filtration module (1) and a method for the separation of biomolecules from a liquid, by means of membranes (3) with microporous membrane bodies to which affinity ligands are coupled, which are capable of interacting with the biomolecules for separation, whereby water is extensively removed from the membrane body, after coupling of the affinity ligand, in a drying process with retention of the activity, whereby the membranes may be stored dry as required and subsequently the biomolecules are separated off by filtering the fluid through the membranes.

(57) Zusammenfassung: Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, wobei der Membrankörper unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist. Filtrationsmodul (1) und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen (3) mit mikroporösen Membrankörpern (4) an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, wobei dem Membrankörper nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang unter Beibehaltung der Aktivität weitgehend Wasser entzogen wird, wobei bei Bedarf die Membranen trocken zwischengelagert werden, und wobei anschliessend die Flüssigkeit durch die Membranen filtriert und die Biomoleküle abgetrennt werden.

WO 2004/009223 A1



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

5

Membran, Filtrationsmodul und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit

Die Erfindung betrifft eine Membran bestehend aus einem 10 mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Filtrationsmodul zur 15 Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von 20 Membranen mit chemisch aktivierten mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind.

25 Gelförmige kugelförmige Träger für Affinitätsliganden werden seit längerem in vielen Bereichen der Biotechnologie zur Reinigung und Abtrennung der verschiedensten Biomoleküle eingesetzt. Ein Beispiel dafür sind die Affinitätsträger auf Agarosebasis welche in Suspension in den Handel kommen. 30 Das Suspensionsmedium kann dabei Wasser oder ein anderes Lösungsmittel sein. Nur wenige Matrices werden in lyophili- sierter Form angeboten.

Weiterhin ist es schwierig bis unmöglich einmal in wässri- 35 gem Medium gequollene Matrices wieder zu trocknen, da die

Gelkugelchen dabei irreversibel geschädigt werden. Die Aufbewahrung und der Transport solcher Gele stellen also ein erhebliches logistisches Problem dar.

- 5 Aus der EP 0 787 523 A1 ist bekannt, zur affinen Stofftrennung an ein Trägermaterial Liganden zu kuppeln, die die Funktion haben, eine einzelne Zielsubstanz oder auch eine ganze Klasse von Substanzen adsorptiv spezifisch zu binden.
- 10 Weiter ist aus der DE 196 17 775 A1 bekannt, Membranadsorber bzw. Membranen zu verwenden, die Liganden tragen, die zur Wechselwirkung mit mindestens einem Stoff einer mit ihm in Kontakt stehenden flüssigen Phase befähigt sind. Der Transport der flüssigen Phase durch die Membran hindurch
- 15 erfolgt dabei konvektiv aufgrund einer Druckdifferenz.

Nachteilig bei der bekannten Abtrennung von Biomolekülen ist, dass die Träger bzw. Membranen mit den angekoppelten Affinitätsliganden aufwendig an einer Austrocknung gehindert werden müssen, um einen Verlust der Bioaktivität der Liganden zu vermeiden. Ein wassernasser Zustand der Membranen birgt zudem die Gefahr eines mikrobiellen Angriffes und bedingt die Notwendigkeit ein Konservierungsmittel zuzusetzen.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Membranen zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Affinitätsliganden bereitzustellen, so dass deren umständliche und kostenintensive nasse Lagerung vermieden

30 werden kann.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 1 dadurch gelöst, dass der Membrankörper mit dem Affinitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

Dadurch, dass der Membrankörper praktisch ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken lagerbar ist, können die Lager- und Transportkosten wesentlich verringert werden. Die 5 Abtrennung der Biomoleküle vereinfacht sich.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Affinitätsliganden, wie Proteinen, beladene Membranen längere Zeit ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken 10 gelagert werden können. Dabei handelt es sich um mikroporöse Membranen der Fa. Sartorius AG Göttingen, die unter dem Handelnamen Sartobind ® erhältlich sind. Unter „trocken“ soll dabei verstanden werden, dass das Porenvolumen der Membran bzw. des Membrankörpers im 15 wesentlichen durch Luft ausgefüllt ist. Dies schließt nicht aus, dass die innere Oberfläche von einer schwer flüchtigen organischen Substanz bedeckt ist.

Geeignet sind Membranen mit mikroporösen adsorptiven Membrankörpern auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat 20 (CA), Cellulosenitrat (CN), Polyamid, PESU, PP, PVDF. Die Porengröße beträgt zwischen 0,01 bis 15 µm. Bevorzugt wird eine Porengröße zwischen 0,2 und 5 µm. Der Membrankörper weist weiterhin eine Dicke zwischen 100 und 500 µm, vor- zugsweise von 200 bis 300 µm auf.

25 Die Membranen sind vorzugsweise chemisch aktiviert, so dass die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt werden. Es ist aber auch eine physikalische Anbindung der Affinitätsliganden an die Membran möglich.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Membrankörper eine Imprägnierung mit Glycerin auf. Die Glycerinimprägnierung trägt dazu bei, dass beim Trocknungs-

prozess die Struktur der mikroporösen Membran bzw. des Membrankörpers nicht beschädigt wird.

Mögliche Affinitätsliganden sind dem Fachmann bekannt. Als 5 Beispiele für adsorptive Liganden werden genannt:

- Thiophile,
- hydrophobe der verschiedenen Kettenlängen und Konfigurationen
- 10 - Reversed Phase,
- reaktive und andere Farbstoffe,
- niedermolekulare ungeladene oder geladene organische Moleküle,
- Aminosäuren und Analoga,
- 15 - Coenzyme, Cofaktoren und deren Analoga,
- Substrate und deren Analoga,
- endokrine und exokrine Substanzen wie Hormone und hormonähnlich wirkende Effektoren und deren Analoga,
- Enzym-Substrate, -Inhibitoren und deren Analoga,
- 20 - Fettsäuren, Fettsäurederivate, konjugierte Fettsäuren und deren Analoga.
- Nukleinsäuren
- DNA, und deren Analoga und Dérivate,
- RNA und deren Analoga und Derivate,
- 25 - Monomere und deren Analoga und Derivate,
- Oligo- bis Polymere und deren Analoga und Derivate,
- hochmolekulare Kohlenhydrate linear oder verzweigt; unsubstituiert oder substituiert,
- Glycokonjugate, wie
- 30 - Heparin,
- Amylose, Zellulose,
- Chitin, Chitosan,
- Monomere und Oligomere,
- deren aller Derivate und Analoga,
- 35 - Lignin und dessen Derivate und Analoga.

- Hochmolekulare Liganden wie
 - Proteine und ihre Oligomere, Multimere, Untereinheiten, sowie Teile davon,
 - Peptide, Polypeptide deren Analoga und Derivate,
 - 5 - Lectine,
 - Antikörper und Teile davon,
 - Fusionsproteine,
 - Haptene,
 - Enzyme und Untereinheiten sowie Teile davon,
- 10 - Strukturproteine,
- Rezeptoren und Effektoren sowie Teile davon,
- Xenobiotika
- Pharmazeutika und Pharmazeutische Wirkstoffe
- Alkaloide
- 15 - Antibiotika
- Biomimetika

20 Weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtungen bzw. ein Filtrationsmodul anzugeben, dass zur kostengünstigen und effektiven Abtrennung von Biomolekülen geeignet ist.

25 Diese weitere Aufgabe wird erfindungsgemäß in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 9 dadurch gelöst, dass die Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8 ausgebildet ist.

30 Durch die Ausbildung der Membrane nach einem der Ansprüche 1 bis 8 weist das Filtrationsmodul die oben genannten Vor- teile auf.

35 Insbesondere kann durch die Verwendung einer Mehrzahl von Membranen eine selektive Trennung verschiedener Biomoleküle erreicht werden. Die Membranen können zudem dem jeweiligen Trennproblem relativ einfach angepasst werden. Die Membra-

nen können mehrlagig in einem Gehäuse angeordnet werden. Sie können aber auch hintereinander in unterschiedlichen Gehäusen oder Gehäusekammern angeordnet werden

5 Die bekannten Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen weisen die oben genannten Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes und kostengünstiges Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer zu prozessierenden Flüssigkeit anzugeben, das auf eine umständliche nasse Lagerung und Transport verzichten kann.

15 Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 12 dadurch gelöst, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

- a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper,
- b) Spülen des Membrankörpers mit mindestens einem Spülmedium,
- c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
- d) trockene Zwischenlagerung der Membranen bei Bedarf und
- e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen, so dass die Biomoleküle abgetrennt werden.

25 Durch die mögliche trockene Lagerung der Membran ohne Aktivitätsverlust wird sowohl die Lagerung als auch der Transport vereinfacht und damit kostengünstiger.

30

Um die Gefahr eines mikrobiellen Angriffs bei Verwendung von Wasser als Spülmedium weitgehend auszuschließen, wird die Membran vorzugsweise auf eine Wasseraktivität von $\leq 40\%$ getrocknet. Unter Wasseraktivität ist dabei der Gleichge-

wichtspartialdruck des Wassers bezogen auf reines Wasser der gleichen Temperatur zu verstehen.

Dem letzten Spülmedium nach Schritt b) kann noch in einem Schritt b1) eine schwer flüchtige, mit dem Spülmedium 5 mischbare, organische Substanz bzw. Komponente als Imprägnierungsmittel zugefügt werden. Das Imprägnierungsmittel verbleibt bei dem Trocknungsvorgang in der Membrane. Es kann auf der Porenoberfläche einen Film bilden oder die Membranmatrix in einem gequollenen Zustand erhalten.

10

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielhaft veranschaulicht sind.

15

Figur 1: Eine schematische Darstellung eines Filtermoduls mit einer in einem Gehäuse angeordneten Membran,

20

Figur 2: eine schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in Gehäusen hintereinander geschalteten Membran und

25

Figur 3: eine Schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in einem Gehäuse mehrlagig angeordneten Membranen.

Ein Filtermodul 1 zum Abtrennen von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit besteht im Wesentlichen aus einem Gehäuse 2 und 30 einer Membran 3 mit einem Membrankörper 4.

Das Gehäuse 2 weist einen Zufluss 5 und einen Abfluss 6 auf. Die Membran 3 mit ihrem mikroporösen adsorbtiven Membrankörper 4 ist auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Polyamid, PESU, PP, PVDF ausgebildet 35

und weist eine Porengröße zwischen 0,01 bis 15 μm , vorzugsweise 0,2 bis 5 μm auf. Der flächig ausgebildete Membrankörper 4 weist dabei eine Dicke zwischen 100 und 500 μm , vorzugsweise 200 bis 300 μm auf. An den Membrankörper 4 sind dem Fachmann bekannte (nicht dargestellte) Affinitätsliganden gekuppelt. Die Affinitätsliganden werden so ausgesucht, dass sie zu einer Wechselwirkung mit dem aus der zu prozessierenden Flüssigkeit abzutrennenden Biomolekül befähigt sind.

10

Die Membran 3 kann entsprechend Fig. 1 einlagig in dem Gehäuse 2 angeordnet sein. Mehrere Gehäuse 2 mit Membranen 3 können dabei hintereinander angeordnet werden.

15

Des ist aber auch möglich, die Membranen 3' mehrlagig in einem Gehäuse 2' anzuordnen. An die Membran 3, 3' wird der nicht dargestellte Affinitätsligand chemisch angekuppelt, die Membran 3, 3' mit Glycerin imprägniert und anschließend einem Trocknungsprozess unterzogen. Dabei wird der Membran 3, 3' weitgehend das Wasser entzogen. Nach einer Trockenlagerung bzw. nach einem Transport wird der Membran 3, 3' über den Zufluss 5 die zu prozessierende Flüssigkeit zugeführt und konvektiv durch die Membran transportiert, so dass sie über den Abfluss 6 abfließen kann. Die abzutrennenden Biomoleküle werden dabei an die Affinitätsliganden gebunden.

Beispiel:

Die nachfolgend mit PBS bezeichnete Lösung wurde, wie in J. 30 Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis „Molecular Cloning“ A Laboratory Manual, second edition Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, Book 3, Appendix B.12 beschrieben, wie folgt hergestellt:

g/l	Substanz
8,0	Natriumchlorid NaCl
0,20	Kaliumchlorid KCl
1,44	di-Natriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄
0,24	Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄
pH 7,4 ± 0,2	

Eine mit Aldehydgruppen funktionalisierte mikroporöse Membranen des Typs Sartobind® Aldehyde Membrane code 19306 wurde mit Protein A umgesetzt. Dazu wurde Protein A der Fa. 5 Repligen, Bezeichnung rPrA Lot Nr. 011038 zu 10 mg/ml in PBS gelöst. Drei Filterronden mit 25 mm Durchmesser wurden mit 2 ml dieser Lösung in einer kleinen Plastikpetrischale für 3 h bei Umgebungstemperatur geschüttelt. Zur Reduktion der entstandenen Schiffsschen Basen wurde 1% Endkonzentration Cyanoborhydrid zugesetzt. Nach Ablauf der Umsetzung wurden die Membranen entnommen und in eine frische Petrischale überführt. Zur Reduktion der restlichen Aldehydgruppen wurden 5 ml einer Lösung von Natrium-Borhydrid in PBS mit einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und die Membranen für 10 weitere 15 min geschüttelt. Die Membranen wurden danach nacheinander mit PBS, einer Lösung von 0.1 M Glyzin pH 2,7, 1 mM HCl, 1 mM NaOH und 1 M NaCl in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 gespült. Die Membranen wurden mit einer Lösung von 22% w/v Glycerol in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 imprägniert. Die Membranen wurden dann bei Umgebungstemperatur in 15 einem Luftstrom für 3 h getrocknet und bei 4°C unter weitgehendem Luftabschluss gelagert.

Nach bestimmten Zeiten wurden Membranen entnommen und auf ihre Bindungskapazität für humane Immunglobuline des Typs 20 IgG1 und IgG2 getestet.

Dabei wurden drei der oben beschriebenen Membranen mit 25 mm Durchmesser in ein Spritzenvorsatz Best. Nr. 16517 der

Fa. Sartorius AG eingebaut und mit einer Einwegspritze versehen.

Humanes abgelaufenes Plasma einer örtlichen Blutbank wurde 1:40 mit PBS verdünnt und diese Lösung über 0.2 µm membran-
5 filtriert. 10 ml dieser so erhaltenen Lösung wurde in die Spritze gefüllt und durch Schwerkraft über die drei einge-
bauten Membranen filtriert. Dann wurde mit 10 ml PBS ge-
spült und die gebundene Menge IgG durch 10 ml 0.1 M Glyzin
10 pH 2.7 eluiert. Die Absorption der Elutionslösung bei 280
nm wurde in einem Spektralphotometer bestimmt und an Hand
einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin als Verbleichsstu-
15 stanz die Proteinbindekapazität der Membrane bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tabel-
15 le dargestellt.

Tabelle: Zeitliche Veränderung der IgG Bindekapazität von Protein A beladenen aldehyd-funktionalisierten Membranen

Zeit (Tage)	Bindekapazität (µg/cm ²)
0	42
1	41
4	47
20	43
45	40
56	37

Patentansprüche

5

1. Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') mit dem Affinitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

10

2. Membran nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') chemisch aktiviert und die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt sind.

15

3. Membran nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Affinitätsligand ein bioaktives Molekül ist, dessen Spezifität und / oder Kapazität im getrockneten Zustand des Membrankörpers (4, 4') im Wesentlichen erhalten bleibt.

20

4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,01 bis 15 µm aufweist.

25

5. Membran nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,2 bis 5 µm aufweist.

30

6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 100 bis 500 µm aufweist.

7. Membran nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 200 bis 300 µm aufweist.

5 8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass dem Membrankörper (4, 4') nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang weitgehend Wasser entzogen wurde.

10 9. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Glycerinimprägnierung aufweist.

15 10. Filtrationsmodul zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membran (3, 3', 3'') nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet ist.

20 11. Filtrationsmodul nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3'') mehrlagig in dem Gehäuse (2'') angeordnet ist.

25 12. Filtrationsmodul nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3') in Gehäusen (2') hintereinander angeordnet sind.

30 13. Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen mit mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

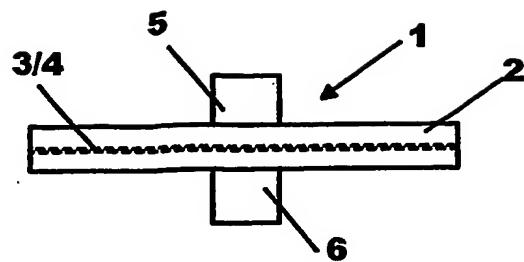
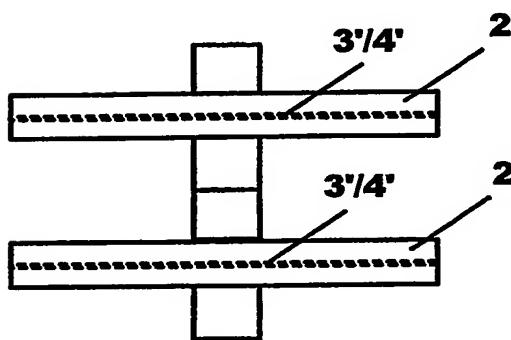
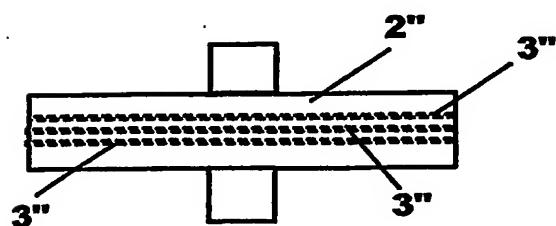
a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper (4, 4'),

- b) Spülen des Membrankörpers (4, 4') mit mindestens einem Spülmedium,
- c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
- 5 d) trockene Zwischenlagerung der Membranen (3, 3', 3'') bei Bedarf und
- e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen (3, 3', 3''), so dass die Biomoleküle abgetrennt werden.

10 14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Anschluss an Schritt b) der folgende Schritt eingefügt wird:

15 b1) Zusetzen einer schwer flüchtigen mit dem Spülmedium mischbaren organischen Komponente in das Spülmedium zum Ende der Spülung nach Schritt b).

15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass Glycerin als schwer flüchtige organische Komponente zugesetzt wird.

**Fig. 1****Fig. 2****Fig. 3**

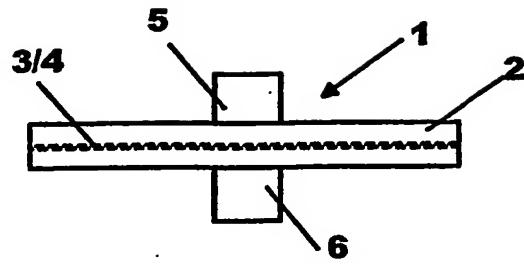


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/06564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01D67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 03317 A (SARTORIUS GMBH) 21 March 1991 (1991-03-21) page 7, line 6-16; example 3 ---	1-10, 13-15
X	EP 0 611 592 A (PALL CORP) 24 August 1994 (1994-08-24) page 6, line 36-51; examples XIII, XV, -XVII ---	1-13
X	US 2001/021413 A1 (BRUENING RONALD L ET AL) 13 September 2001 (2001-09-13) paragraphs '0013!-'0019!; examples 1,3-7,11,13 ---	1,2,4-9, 13
X	US 5 766 908 A (KLEIN ELIAS ET AL) 16 June 1998 (1998-06-16) examples 5,6 ---	1-10, 13-15 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

26 September 2003

Date of mailing of the International search report

07/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Semino, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06564

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 286 449 A (KURODA TORU ET AL) 15 February 1994 (1994-02-15) column 7, line 51-62 column 15, line 26; example 1 -----	1-10,13
A	YANG L ET AL: "Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoabsorption", JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL.COMPANY. AMSTERDAM, NL, VOL. 197, NR. 1-2, PAGE(S) 185-197 XP004334318 ISSN: 0376-7388 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/06564

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9103317	A 21-03-1991	DE	4028355 A1	14-03-1991
		DE	59009030 D1	08-06-1995
		WO	9103317 A1	21-03-1991
		EP	0490938 A1	24-06-1992
EP 0611592	A 24-08-1994	GB	2275270 A	24-08-1994
		WO	9417903 A2	18-08-1994
		EP	0611592 A2	24-08-1994
US 2001021413	A1 13-09-2001	US	5980987 A	09-11-1999
		US	5618433 A	08-04-1997
		US	5547760 A	20-08-1996
		AT	237398 T	15-05-2003
		AU	686796 B2	12-02-1998
		AU	2295295 A	16-11-1995
		BR	9507546 A	05-08-1997
		CA	2188649 A1	02-11-1995
		CN	1151128 A , B	04-06-1997
		CZ	9603097 A3	17-09-1997
		DE	69530384 D1	22-05-2003
		EP	0757589 A1	12-02-1997
		FI	964305 A	23-12-1996
		HU	75287 A2	28-05-1997
		JP	3100638 B2	16-10-2000
		JP	9511948 T	02-12-1997
		LT	96152 A , B	26-05-1997
		LV	11791 A	20-06-1997
		NO	964536 A	25-10-1996
		NZ	284360 A	26-01-1998
		PL	317023 A1	03-03-1997
		WO	9529008 A1	02-11-1995
US 5766908	A 16-06-1998	EP	0880544 A1	02-12-1998
		JP	11503005 T	23-03-1999
		WO	9627614 A1	12-09-1996
US 5286449	A 15-02-1994	AU	3237489 A	05-10-1989
		CA	1325770 C	04-01-1994
		DE	68910175 D1	02-12-1993
		DE	68910175 T2	17-02-1994
		EP	0341413 A2	15-11-1989
		JP	2029260 A	31-01-1990
		JP	2814399 B2	22-10-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06564

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01D67/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 91 03317 A (SARTORIUS GMBH) 21. März 1991 (1991-03-21) Seite 7, Zeile 6-16; Beispiel 3 ---	1-10, 13-15
X	EP 0 611 592 A (PALL CORP) 24. August 1994 (1994-08-24) Seite 6, Zeile 36-51; Beispiele XIII,XV,-XVII ---	1-13
X	US 2001/021413 A1 (BRUENING RONALD L ET AL) 13. September 2001 (2001-09-13) Absätze '0013!-'0019!; Beispiele 1,3-7,11,13 ---	1,2,4-9, 13
X	US 5 766 908 A (KLEIN ELIAS ET AL) 16. Juni 1998 (1998-06-16) Beispiele 5,6 ---	1-10, 13-15 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Recherchenberichts

26. September 2003

07/10/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Semino, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06564

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 286 449 A (KURODA TORU ET AL) 15. Februar 1994 (1994-02-15) Spalte 7, Zeile 51-62 Spalte 15, Zeile 26; Beispiel 1 -----	1-10,13
A	YANG L ET AL: "Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoabsorption", JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL. COMPANY. AMSTERDAM, NL, VOL. 197, NR. 1-2, PAGE(S) 185-197 XP004334318 ISSN: 0376-7388 das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06564

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9103317	A	21-03-1991		DE 4028355 A1		14-03-1991
				DE 59009030 D1		08-06-1995
				WO 9103317 A1		21-03-1991
				EP 0490938 A1		24-06-1992
EP 0611592	A	24-08-1994		GB 2275270 A		24-08-1994
				WO 9417903 A2		18-08-1994
				EP 0611592 A2		24-08-1994
US 2001021413	A1	13-09-2001		US 5980987 A		09-11-1999
				US 5618433 A		08-04-1997
				US 5547760 A		20-08-1996
				AT 237398 T		15-05-2003
				AU 686796 B2		12-02-1998
				AU 2295295 A		16-11-1995
				BR 9507546 A		05-08-1997
				CA 2188649 A1		02-11-1995
				CN 1151128 A ,B		04-06-1997
				CZ 9603097 A3		17-09-1997
				DE 69530384 D1		22-05-2003
				EP 0757589 A1		12-02-1997
				FI 964305 A		23-12-1996
				HU 75287 A2		28-05-1997
				JP 3100638 B2		16-10-2000
				JP 9511948 T		02-12-1997
				LT 96152 A ,B		26-05-1997
				LV 11791 A		20-06-1997
				NO 964536 A		25-10-1996
				NZ 284360 A		26-01-1998
				PL 317023 A1		03-03-1997
				WO 9529008 A1		02-11-1995
US 5766908	A	16-06-1998		EP 0880544 A1		02-12-1998
				JP 11503005 T		23-03-1999
				WO 9627614 A1		12-09-1996
US 5286449	A	15-02-1994		AU 3237489 A		05-10-1989
				CA 1325770 C		04-01-1994
				DE 68910175 D1		02-12-1993
				DE 68910175 T2		17-02-1994
				EP 0341413 A2		15-11-1989
				JP 2029260 A		31-01-1990
				JP 2814399 B2		22-10-1998